

The human colon canaer cell line CaCo-2  
produces secretory components during  
enterocytic differentiation

著者	平田 真人
発行年	1993-03-23
その他の言語のタイトル	ヒト大腸菌癌細胞株aCo-2SCにおけるSC産生能の検討 ヒト ダイチョウキン ガンサイボウカブ aCo 2SC ニ オケル SC サンセイノウ ノ ケントウ
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10422/1945">http://hdl.handle.net/10422/1945</a>

氏名・（本籍）	平 田 真 人（滋賀県）
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	博 士 第139号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成5年3月23日
学位論文題目	The human colon canaer cell line CaCo-2 produces secretory components during enterocytic differentiation ヒト大腸癌細胞株aCo-2SCにおけSC産性能の検討）
審 査 委 員	
主査 教授 小 玉 正 智	
副査 教授 服 部 隆 則	
副査 教授 細 田 四 郎	

## 論 文 内 容 要 旨

### 〔目 的〕

Sesretory component (SC) は小腸上皮細胞で産生され、IgAと細胞の基底部および外側部で結合し、Secretory IgA (S-IgA) として小腸粘膜上に転送分泌され、小腸粘膜防御機構を担うことが知られている。小腸上皮細胞において分化にともなうSC産生量の変化、あるいは、IgAやサイトカインなどによるSC産生の調節について不明な点が多い。CaCo-2細胞株はヒト大腸眼細胞株であるが、confluenceになると小腸上皮細胞様の分化を開始する。分化したCaCo-2細胞は刷子縁粘膜酵素活性を発現し成熟した吸収細胞の性質を持つようになることから、小腸上皮細胞の分化のモデルとして用いられている。本研究ではCaCo-2細胞の培養上清中へのSC産生能について検討した。さらにCaCo-2細胞におけるIgAとサイトカインによるSC産生の調節についても検討した。

### 〔方 法〕

CaCo-2細胞を60mmプラスチックのPetri皿上で培養し、3日毎に培地を交換した。培地には20% ウシ胎児血清を含有するDulbeccoの変法培地を用いた。

①培養上清中へのCaCo-2細胞のSC産生の確認を、培養12日目から培養15日目の培養上清において抗SC抗体を用いimmunoblot法でおこなった。培養上清中のSC量を、培地にpolymeric IgAを添加しS-IgA量としてELISA（抗SC抗体とALP標識の抗IgA抗体を用いるdouble sandwich法）にて測定した。②CaCo-2を培養開始後12日目から15日目の3日間、monomeric IgA、または、polymeric IgAを含む培地で培養した場合、あるいは培養後の培養上清にpolymeric IgAを添加した場合のS-IgA量を測定し比較した。③培養27日目まで、3日毎に交換した培養上清中のS-IgA量について経時的に測定した。CaCo-2の分化の指標として、alkaline phosphatase活性を測定した。④interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ )、tumor nesrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、interleukin-4 (IL-4)を培地中に添加し3日間培養し、S-IgA量を測定した。controlとして通常の培養上清中のS-IgA量を測定した。

### 〔結 果〕

①immunoblot法にて、培養12-15日目の培養上清中に、抗SC抗体に反応する分子量72kの単一のバンドを認めた。②培養液に培養前から、monomerisIgAを添加した場合のS-IgA量は、1 ng/mg of cell protein以下であった。培養上清中にS-IgAは、polymeric IgAを添加して培養した場合と培

養後にpolymeric IgAを添加した場合は、培養上清中のS-IgA量に差を認めなかった。③CaCo-2細胞の増殖は、培養6日目でconfluenceとなり、培養細胞数は培養12日目に一定となった。培養上清中のS-IgA量は、培養3-6日目、

6-9日目、9の12日目、12-15日目、15-18日目、18-21日目、21-24日目、24-27日目に、それぞれ2.0、5.1、20.2、29.5、15.8、3.0、2.4、2.7ng/mg of cell proteinであった。すなわち、培養上清中のS-IgA量は、confluence後増加し培養12-15日目（confluence後6-9日目）に最大産生量を認め、以後減少した。分化の指標であるCaCo-2細胞のAlkaline phosphatase活性は、培養24日目（confluence後18日目）まで経時的に増加した。⑤INF- $\gamma$ の添加により用量依存性にCaCo-2細胞の培養上清中のS-IgA量は増加した。INF- $\gamma$ 、IL-4は添加したCaCo-2細胞の培養上清中のS-IgA量はcontrolと同程度であった。

#### [考 察]

CaCo-2細胞の培養上清中にSCの産生を認め、そのSC産生量はCaCo-2細胞の分化の初期にピークとなり以後細胞の分化とともに減少した。ヒト小腸上皮でのSCの分布は、陰窩にもっとも多く分布し絨毛先端に向かうにつれ少なくなる。逆にalkaline phosphatase活性は陰窩から絨毛先端に移動するにつれて高くなる。CaCo-2細胞の実験結果と小腸上皮のSC分布状態から、SCはおもに未分化な細胞で産生され、細胞が分化するとSC産生量は低下すると考えられる。また、CaCo-2ではSCの産生はIgAの存在には関係なく産生された。従来、選択的IgA欠損症の患者において腸管粘液中にSCの産生はIgAに無関係であると推測されているが、これを支持する結果であった。CaCo-2のSC産生は、INF- $\gamma$ により調節されていた。INF- $\gamma$ はT細胞から分泌され免疫グロブリンの産生にも関与しており、腸管の免疫機能に密接に関与していることが示唆された。

#### [結 論]

小腸上皮細胞の性質をもつCaCo-2細胞のSC産生能について検討した。(1) CaCo-2はSCを培養上清中に産生した。(2) SC産生量はCaCo-2が未分化で増殖の認められる時期にピークとなり、CaCo-2が分化しなくなるとSC産生量は低下した。(3) CaCo-2のSC産生量は培養液中のIgAには非依存性であった。(4) CaCo-2のSC産性はINF- $\gamma$ により用量依存性に調節された。

#### 学位論文審査の結果の要旨

Secretory IgA (S-IgAと略す)は小腸粘膜で第一線防御機構として働くが、その構成成分であるSecretory component (SC)産生の調節に関与する因子については不明であった。この原因は小腸上皮から単一種類の単離細胞を取り出し、一定期間培養することが難しく、SC産生を調べる小腸上皮細胞のモデルがなかったためである。

本研究は、ヒト大腸癌由来のCaCo-2が小腸上皮細胞の性質を有し、さらに小腸上皮細胞類似の分化能を持っていることを利用し、CaCo-2のSC産生能とその産生を調節する因子について検討したものである。

CaCo-2の培養上清中へのSC産生能をimmunoblotting法を用いて明らかにした。CaCo-2の分化の指標としてalkaline phosphatase活性を測定し、培養上清中へのSC産生をELISAを用い定量化した。この測定結果から、CaCo-2のSC産生は分化の初期にピークを認め、さらに分化がすすむとSCの産生は低下することがわかった。一方、ヒト正常小腸粘膜の免疫染色でSCの分布は陰窩から絨毛

基底部に認めれたことから、小腸上皮細胞とCaCo-2のSC産生能は類似していることを示し、CaCo-2の小腸上皮細胞SC産生モデルとしての有用性を明らかにした。

次に、SC産生の調節についてIgAとサイトカインの関与に関してCaCo-2を用いて検討した。CaCo-2の培養液中の多量体IgA量に関係なくSC産生量は一定であることから、SC産生はIgAに非依存性であることを示した。またCaCo-2のSC産生はinterferon  $\gamma$ により用量依存性に増加することを示した。

これらの結果より、CaCo-2細胞株は小腸上皮細胞のSC産生の有用なモデルであることと、小腸上皮細胞のSC産生がIgA非依存性でinterferon  $\gamma$ により正の制御を受けていることを明らかにした。

以上により、粘膜防御機構として働くS-IgAの産生と分泌の様相が一段と明確にされたものであり、本論文として価値のあるものと認められる。